

Prof. dr hab. Barbara Wiśniowska-Kielian
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej
31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 21,
Tel. +48 12 662 4342, Tel/fax +48 12 662 4341
e-mail: rrkielia@cyf-kr.edu.pl

Kraków, 2.01.2020 r.

Recenzja

pracy doktorskiej **mgr inż. Magdaleny Anny Podbielskiej**

pt. „Wpływ komercyjnego preparatu biologicznego na degradację wybranych fungicydów”

Niniejsza ocena pracy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo Pani prof. dr hab. Anny Jarosz-Wilkołazka, Dyrektor Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z dnia 8.11.2019 roku, z informacją, że Rada Naukowa Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie zwraca się do mnie z prośbą o zrecenzowanie pracy doktorskiej pt. „Wpływ komercyjnego preparatu biologicznego na degradację wybranych fungicydów” mgr inż. Magdaleny Anny Podbielskiej. Przedłożona do recenzji praca doktorska została wykonana w Instytucie Biologii i Biotechnologii Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego, pod kierunkiem promotora dr hab. Ewy Szpyrka, prof. URz. Promotorem pomocniczym była dr Małgorzata Kus-Liśkiewicz.

Ocena problematyki badawczej i celu badań

Głównym celem współczesnego rolnictwa jest zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego, przy jednoczesnym dostarczaniu produktów wysokiej jakości pod względem odżywczym i zdrowotnym. Osiągnięcie tego celu wiąże się z koniecznością ciągłej poprawy efektywności produkcji, w czym ma pomóc stosowanie środków produkcji pochodzących z syntezy chemicznej, w tym nawozów mineralnych i pestycydów. Szczególne niebezpieczeństwo niosą pestycydy w przypadku ich stosowania niezgodnego z zaleceniami, ponieważ mogą pozostawać w produktach roślinnych, przemieszczać się w łańcuchu troficznym oraz rozpraszać się w środowisku, doprowadzając do zanieczyszczenia gleb i wód. Uodparnianie się patogenów na ich działanie zmusza do poszukiwania coraz to nowych substancji, a tym samym do badania ich wpływu nie tylko na patogeny, które mają zwalczać, ale także na inne organizmy współwystępujące w środowisku oraz tempa ich zaniku i produktów przemian jakim podlegają po zastosowaniu. Coraz większą uwagę poświęca się integrowanej produkcji oraz biologicznym metodom zwalczania patogenów i wykorzystaniu mikroorganizmów do degradacji pestycydów, w czym duża rola przypada biotechnologii środowiska.

Fungicydy należą do jednych z najczęściej stosowanych pestycydów, zarówno w celu ochrony roślin w trakcie wegetacji, jak też zabezpieczenia płodów rolnych na okres ich przechowywania. Szczególne zainteresowanie budzą pestycydy stosowane w sadach jabłoniowych, ze względu na duże znaczenie jabłek w żywieniu człowieka, które obok kapusty są ważnym elementem diety, zarówno w Polsce jak i na świecie. Jak wynika z badań prowadzonych w Instytucie Ochrony Roślin - Państwowym Instytucie Badawczym,

pozostałości pestycydów stwierdza się w owocach, warzywach i innych płodach rolnych pochodzących z różnych rejonów kraju oraz z różnych systemów rolnictwa.

Celem badań, których efektem jest przedstawiona praca doktorska, była ocena w warunkach laboratoryjnych przeżywalności bakterii *Bacillus subtilis* i drożdży referencyjnych *Saccharomyces cerevisiae* (naturalnie bytujące na owocach), pod działaniem substancji czynnych fungicydów: boskalidu, fluopyramu, pentiopiradu, pyraklostrobiny i tebukonazolu oraz stopnień degradacji tych substancji przez *B. subtilis*, *Trichoderma harzianum* i ich mieszaną kulturę. Natomiast w warunkach polowych oceniano dynamikę degradacji tych substancji czynnych zastosowanych w preparatach Luna Experience 400 SC, Bellis 38 WG i Fontelis 200 SC w jabłkach odmian Boskoop, Gala, Gloster, Golden Delicious i Red Jonaprince pod wpływem komercyjnego preparatu biologicznego Zumba Plant®. Ponadto oceniono czy po zastosowaniu fungicydów jabłka zawierają groźne dla zdrowia człowieka mikotoksyny: patulinę, zearalenon oraz trichoteceny grupy A i B: diacetoksycirpenol, toksynę HT-2, toksynę T-2, deoksyniwalenol i niwalenol, wytwarzane przez grzyby z rodzajów *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium* i *Penicillium* porażające rośliny w trakcie uprawy.

W dostępnej literaturze brakuje informacji dotyczących degradacji fungicydów przez mikroorganizmy, zwłaszcza w warunkach polowych, dlatego podjęcie badań z tego zakresu należy uznać za zasadne.

Formalna analiza pracy

Dysertacja liczy 134 strony wraz ze spisem literatury (113 stron zajmuje tekst pracy, bez spisu treści i literatury), zawiera 36 tabel, 56 rysunków, w tym 8 fotografii. Uzyskane przez Autorkę wyniki badań zostały przedstawione w formie 23 tabel i 36 rysunków. Praca obejmuje 10 rozdziałów, a poszczególne rozdziały mają następującą objętość:

- Wstęp - 27 stron (20,9%),
- Cel i zakres pracy - 2 strony (1,6%),
- Część doświadczalna - 25 stron (19,4%), w tym 26 podrozdziałów I, II i III rzędu,
- Wyniki badań - 43 strony (33,3%), w tym 17 podrozdziałów I i II rzędu,
- Dyskusja - 11 stron (8,5%)
- Wnioski - 1 strona (0,8%),
- Podsumowanie - 1 strona (0,8%),
- Summary - 1 strona (0,8%),
- Wykaz stosowanych skrótów - 2 strony (1,6%),
- Literatura - 16 stron (12,4%).

Układ pracy jest odmienny od najczęściej spotykanego, w którym „Wstęp” stanowi krótkie ogólne wprowadzenie w tematykę badawczą, a aktualny stan wiedzy w zakresie podjętej tematyki jest omawiany w „Przeglądzie literatury”. W tym przypadku „Wstęp” stanowi połączenie tych dwóch elementów.

Uzyskane w badaniach dane liczbowe opracowano statystycznie. Doktorantka wykazała umiejętność poprawnego zestawiania wyników badań. Jednak nie ustrzegła się błędów, z których część wskazano w dalszej części recenzji.

Merytoryczna analiza pracy

Badania zostały zaplanowane poprawnie do realizacji podjętego tematu. Praca przedstawiona do recenzji została przygotowana w oparciu o oryginalne badania przeprowadzone *in vitro* i *in vivo* oraz wyniki analiz laboratoryjnych próbek pobranych z obiektów, w których zastosowano oceniane substancje czynne fungicydów i badane mikroorganizmy lub komercyjne fungicydy i preparat biologiczny, zgodnie z koncepcją

naukową Autorki. Wyniki analiz porównano z tymi uzyskanymi w próbkach pobranych z obiektów kontrolnych, w których zastosowano tylko oceniane substancje czynne fungicydów.

Tytuł rozprawy doktorskiej jej zgodny z jej treścią. Doktorantka uzyskała interesujące wyniki doświadczeń, na ogół poprawnie je zestawiała i omówiła.

Większość zależności fungicyd – mikroorganizm stwierdzonych przez Doktorantkę w warunkach laboratoryjnych nie była statystycznie istotna, ponieważ różnice mieściły się w zakresie błędu doświadczalnego, zobrazowanego w formie słupków błędów na wykresach. Zanotowano nawet większą żywotność *B. subtilis* w każdym terminie próbobrania pod wpływem fluopyramu, po 3, 5 i 7 dniach inkubacji po zastosowaniu baskalidu, a po 3 dniach po aplikacji pentiopiradu i pyraklostrobiny niż w obiektach kontrolnych. W pozostałych terminach zanotowano ograniczenia żywotności *B. subtilis* przez baskalid, pentiopirad i pyraklostrobinę. Wyraźne silne ograniczenie metabolicznej aktywności tej bakterii zanotowano już po 3 dniach inkubacji z tebukonazolem, które nasilało się wraz z przedłużaniem czasu oddziaływania tej substancji.

Następnie oceniono rozwój *B. subtilis* i *S. cerevisiae* w czasie 24 godzinnej ekspozycji na działanie zwiększanych stężeń substancji czynnych fungicydów w celu wyznaczenia wartości ich minimalnego stężenia inhibującego (MIC) i minimalnego stężenia bójczego (MBC), które oceniano w testach wzrostu na płytkach Petriego. Nie wykazano oddziaływania baskalidu, fluopyramu i pentiopiradu. Natomiast ustalono wartości MIC dla *B. subtilis* w przypadku pyraklostrobiny (stężenie $\geq 5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, rys. 23a) i tebukonazolu (stężenie $\geq 100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, rys. 23b, stężenie $\geq 20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, rys. 24b), a MBC tylko dla tebukonazolu (stężenie $\geq 100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, rys. 24b). W przypadku *S. cerevisiae* potwierdzono działanie inhibujące i bójcze tylko dla tebukonazolu, odpowiednio przy stężeniach $\geq 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (rys. 26) oraz $\geq 500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (rys. 27).

Badając stopień degradacji substancji czynnych przez *B. subtilis* w warunkach laboratoryjnych, stwierdzono najczęściej regularne nasilenie rozkładu w czasie, który był największy w przypadku fluopyramu (3-7,6%), a najmniejszy dla tebukonazolu (0,2-0,5%). Degradacja pentiopiradu była najbardziej wyrównana; już po 3 dniach *B. subtilis* rozłożył 5,5% substancji, a w pozostałych terminach 4,3-6,6% w stosunku do obiektu kontrolnego. Różnice te nie były statystycznie istotne.

Większe nasilenie degradacji substancji czynnej zanotowano w przypadku *T. harzianum*, który rozkładał najwięcej pyraklostrobiny (83,7-99,4%), porównywalne ilości baskalidu (79,6-82,5%) i fluoropyramu (74,3-81,9%), następnie pentiopiradu (34,1-56,8%), a najmniej tebukonazolu (44,5-49,1%). Różnice te były statystycznie istotne w stosunku do obiektu kontrolnego.

Mieszanina kultur *B. subtilis* i *T. harzianum* zdegradowała najwięcej baskalidu (64,8-66,7%), porównywalną ilość pyraklostrobiny (64,1-64,4%), następnie pentiopiradu (23,7-29,1%). Różnice te były statystycznie istotne w stosunku do obiektu kontrolnego. Mieszanina kultur bakterii i grzyba zdegradowała znacznie mniej fluoropyramu (8,3-24,1%) i tebukonazolu (6,1-23,3%). Różnicę istotną zanotowano tylko po 7 dniach działania tebukonazolu. Słabsze degradujące działanie mieszaniny kultur bakterii i grzyba na substancje czynne fungicydów niż *T. harzianum* mogą wskazywać na osłabianie działania tego grzyba przez *B. subtilis*.

W warunkach polowych Doktorantka oceniała stopień rozkładu substancji czynnych zawartych w preparatach fungicydowych zastosowanych w sadach jabłoniowych, zachodzącego w naturalnych warunkach oraz pod działaniem preparatu biologicznego Zumba Plant®, który zawiera szczepy bakterii *B. subtilis*, grzyba *Trichoderma* spp. i *Glomus* spp. W oparciu o krzywe zanikania w próbkach jabłek z obiektów kontrolnych wyznaczyła okresy połowicznego rozpadu baskalidu, fluopyramu, pentiopiradu, pyraklostrobiny i tebukonazolu. Po zastosowaniu preparatu Zumba Plant® obserwowano zazwyczaj nasilony rozkład

substancji czynnych w relacji do próbek kontrolnych, ale różnice najczęściej malały w czasie i zależały od odmiany.

W 2016 r. rozkład boskalidu, zawartego w preparacie Bellis 38 WG, w jabłkach odmiany Gloster po 4, 8, 12 i 15 dniach po aplikacji preparatu Zumba Plant® był większy niż w próbkach kontrolnych odpowiednio o około 52, 42, 18 i 2%, a pyraklostrobiny o 40, 23, 23 i 0%. W 2018 r. po aplikacji preparatu Zumba Plant® obserwowano większy niż w próbkach kontrolnych rozkład boskalidu w jabłkach odmiany Boskoop tylko o około 6 i 2%, odpowiednio po 1 dniu i po 8 dniach, a pyraklostrobiny o 3% tylko po 1 dniu.

W 2017 r. degradacja pentiopiradu, zawartego w preparacie Fontelis 200 SC, w jabłkach odmiany Gala po 1, 5, 8 i 14 dniach po aplikacji preparatu Zumba Plant® była większa odpowiednio o około 3, 2, 20 i 14% niż w próbkach kontrolnych. W 2018 r. rozkład pentiopiradu w jabłkach odmiany Golden Delicious po 1, 5, 8 i 14 dniach po aplikacji preparatu Zumba Plant® był większy odpowiednio o około 2, 1, 21 i 19% niż w próbkach kontrolnych.

W 2017 r. rozkład fluoropiramu, zawartego w preparacie Luna Experience, w jabłkach odmiany Red Jonaprince po 1, 5, 8 i 14 dniach po aplikacji preparatu Zumba Plant® był większy niż w próbkach kontrolnych odpowiednio o około 31, 15, 13 i 23%, a tebukonazolu o 3, 0, 3 i 14%. W 2018 r. po aplikacji preparatu Zumba Plant® degradacja fluoropiramu w jabłkach odmiany Gala po 1, 5, 8 i 14 dniach była większa odpowiednio o około 5, 7, 3 i 0% niż w próbkach kontrolnych, a tebukonazolu tylko o około 1% w każdym z tych terminów.

Rezultaty degradacji fungicydów uzyskane w uprawach jabłoni zależały od przebiegu pogody po zastosowaniu fungicydów i preparatu Zumba Plant®. Zmycie preparatów po opadzie osłabiało skuteczność ich działania, a susza i wysoka temperatura ograniczały przeżywalność oraz aktywność mikroorganizmów zawartych w preparacie biologicznym.

Różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi dla próbek jabłek po aplikacji preparatu Zumba Plant® oraz dla próbek kontrolnych nie były istotne statystycznie ze względu na duże wartości SD, w wielu przypadkach przekraczające połowę wartości średniej, na co wskazują też słupki błędów.

Jabłka wszystkich odmian nie zawierały mierzalnych ilości badanych mikotoksyn.

Dyskusja wyników i ich porównanie z rezultatami uzyskanymi przez innych badaczy, tam gdzie było to możliwe, zostały przedstawione poprawnie. Wnioski są sformułowane syntetycznie, aczkolwiek pomijają część wyników, np. dotyczących mikotoksyn.

Wykaz skrótów powinien być umieszczony przed wstępem.

Literatura obejmuje 183 pozycje, w tym zdecydowana większość w języku angielskim, zarówno autorów krajowych jak i zagranicznych, a 12 sprzed roku 2000, więc można stwierdzić, że większość pozycji literatury jest aktualna. W części „Wstęp” zacytowano 113 pozycji, w „Część doświadczalna” 6 pozycji, w „Wyniki badań” 1 pracę, w „Dyskusja” 71 prac, w tym 9 przywołanych w części „Wstęp”. Nie zastała zacytowana praca 140.

Uwagi do poszczególnych rozdziałów pracy

Przedstawiony wcześniej podział treści wskazuje na zachwianie proporcji między rozdziałami. „Cel i zakres pracy” można było przedstawić w bardziej syntetycznej formie, ponieważ nie ma konieczności 3-krotnego powtarzania nazw substancji czynnych poddawanych degradacji *in vitro* przez poszczególne mikroorganizmy czy nazwy komercyjnego preparatu biologicznego, którym działano na komercyjne fungicydy *in vivo*.

„Część doświadczalna” jest bardzo obszerna, bez wyraźnego podziału na materiały i metody badań. Wykazy stosowanych odczynników i innych materiałów, naczyń laboratoryjnych oraz sprzętu wykorzystywanego do wykonania analiz są przedstawione bardzo szczegółowo. Brakuje odwołań do literatury, w której opisano stosowane metody

analityczne, co umożliwiłoby skrócenie tego rozdziału. W podrozdziale „Analiza statystyczna” podano, że średnie wartości obliczano na podstawie co najmniej 3 eksperymentów, a dotyczy to raczej 3 powtórzeń wykonanych analiz. Nie ma też potrzeby opisywać sposobu obliczania powszechnie znanych parametrów statystycznych, np. SD i RSD.

W rozdziale „Wyniki badań” zamieszczono wyniki optymalizacji i walidacji metod analitycznych, które powinny znaleźć się raczej w rozdziale „Część doświadczalna”.

Dla badanych zależności nie ma znaczenia informacja o ogólnej liczbie przebadanych próbek w doświadczeniach laboratoryjnych lub polowych, którą podano, ponieważ nie są podstawą do oceny statystycznej istotności różnic, bo do tego służą ilości porównywanych par danych z każdego doświadczenia.

Określenie „kontrola”, choć często używany w pracach naukowych, jest niepoprawne, powinien to być „obiekt kontrolny”. Często pomijane jest określenie „zawartość” przy podawaniu ilości substancji w analizowanym materiale.

Dane prezentowane na rysunkach 22, 23, 25 i 26 powinny być przedstawione jako wykresy punktowe ze słupkami błędów, bo nie jest to dynamika mierzona w czasie i nie ma proporcji stosowanych stężeń, skoro najniższe i najwyższe różnią się 50000 razy. Tytuły tych rycin: „Wzrost po 24 godzinach szczepu *B. subtilis* po ekspozycji wobec...” nie są poprawne, powinno być „Wzrost szczepu *B. subtilis* po 24 godzinach ekspozycji na działanie...”. Wartość MIC dla *B. subtilis* w przypadku tebukonazolu ($20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, rys. 23b) została źle podana, ponieważ wzrost bakterii był taki sam jak przy niższych stężeniach, a dopiero stężenie $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ spowodowało inhibicję rozwoju bakterii. Dopiero na płycie Petriego zanotowano osłabienie rozwoju *B. subtilis* przy stężeniu $20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i biobójcze działanie MBC dla stężeń $\geq 100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (rys. 24b). Podobnie błędnie podano stężenie inhibujące w przypadku *S. cerevisiae*, które wystąpiło dopiero przy stężeniu tebukonazolu $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (rys. 26), a bójcze przy stężeniu $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (rys. 27).

Zmiany stężeń substancji czynnych fungicydów po aplikacji *B. subtilis* w wielu przypadkach są niepoprawnie obliczone. W części **Merytoryczna analiza pracy** podałam wartości obliczone na podstawie danych w tabelach. Rysunki 28-36 nie przedstawiają degradacji substancji aktywnej fungicydu (w %), jak wynika z ich tytułów i jak podano w tekście, tylko ich ilość początkową oraz pozostałą po czasie 3, 5, 7 i 14 dni inkubacji mikroorganizmu. Wskazują na co zmiany stężenia tych substancji podane w tabelach 18-26. Skala na osi „y” tych rysunków jest źle dobrana. Rysunki powinien zawrzeć się w kwadracie, lub prostokacie o wydłużonej osi „y”, co umożliwiłoby precyzyjny odczyt wartości.

Dane przedstawione na rysunkach 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 i 55 są zdublowaniem danych zawartych w kolumnach 3. tabel 27-36, ale można to ewentualnie zaakceptować, ponieważ posłużyły do wyznaczenia równań regresji zaniku substancji czynnych oraz współczynników korelacji. Nie jest jasny sposób wyznaczenie okresów połowicznego rozpadu substancji czynnych fungicydów.

Dane zaprezentowane na rysunkach 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 i 56 są zdublowaniem danych zawartych w kolumnach 3. i 5. w tabelach 27-36, co nie jest wskazane w pracy doktorskiej. Zmiany stężeń substancji czynnych można było wyrazić w liczbach względnych, bo tak są przywołane w tekście, lub informacje dotyczące istotności różnic zamieścić w wymienionych tabelach.

Rozdział „Podsumowanie” jest *de facto* streszczeniem pracy i powinien mieć taką nazwę.

W wykazie skrótów niektóre tłumaczenia z języka angielskiego nie są poprawne lub nie są skonfrontowane z ich tłumaczeniem w innych pracach, np. MIC, MRM. Nie wszystkie skróty użyte w pracy znalazły się w tym wykazie.

W pracy jest wiele błędów stylistycznych czy nieprecyzyjnych określeń. Nazwa substancji czynnych fungicydów, np. pyraklostrobliny wg IUPAC nie jest do końca zgodna z podaną w

PubChem. Nadużywane są określenia „spadek”, „spadły” zamiast „zmniejszyły się, obniżyły się”, „wilgoci” zamiast wilgotność, oraz „gdzie” jako określenie czasu, itp. Stosowane są jednostki objętości „l, ml, μ l” spoza układu SI zamiast dm^3 , cm^3 , μm^3 , oraz zapis stężeń „mg/l, $\mu\text{g/l}$ ”, który nie jest zalecany w pracach naukowych (choć często spotykane w przepisach prawnych), zamiast $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, itd. Określenie „gram-negatywne bakterie” raczej nie jest stosowane do określenia bakterii gram-ujemnych. Są błędy w cytowaniu nazwisk autorów, np. Biziuk [11], Broudeur [2018], Youness [169], lub rok publikacji 2014 [51], 2000 [18].

Przedstawione uwagi nie obniżają wartości naukowej rozprawy doktorskiej opracowanej przez Panią mgr inż. Magdalenę A. Podbielską.

Wniosek końcowy

W mojej ocenie Kandydatka na stopień naukowy doktora wykazała dobrą znajomość problemu badawczego, trafnie postawiła cele badawcze, opanowała metody analityczne wykorzystane w pracy naukowej, a także w większości poprawnie zinterpretowała uzyskane wyniki, wyjaśniła większość zależności i porównała je z uzyskanymi przez innych autorów.

Biorąc pod uwagę wymogi określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668) i w Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. RP 2018 r., Poz. 1669) oraz zakres badań, zastosowane metody badawcze, sposób przedstawienia wyników i wnioskowanie stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska mgr inż. Magdaleny A. Podbielskiej pt. „Wpływ komercyjnego preparatu biologicznego na degradację wybranych fungicydów” spełnia wymogi stawiane tego typu opracowaniom, a uzyskane wyniki wnoszą nowe wartości poznawcze do nauki. Oceniana rozprawa doktorska mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplina - nauki biologiczne.

Zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi, określającymi szczegółowo tryb przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich, składam formalny wniosek do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny A. Podbielskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bluelian